УДК 595.422:591.1

В. В. Барабанова, Т. Ф. Галанова

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА РАСТВОРИМЫХ ПРОТЕИНОВ У ЮВЕНИЛЬНЫХ СТАДИЙ VARROA JACOBSONI

В настоящей работе представлены исследования белкового состава гомогенатов ювенильных стадий клеща *Varroa jacobsoni* и гемолимфы тех стадий развития трутневого расплода, которые служат им пищей. Интерес к данным исследованиям связан с тем, что у клеща, являющегося эктопаразитом медоносной пчелы, обнаружена иммунологическая идентичность протеинов его гемолимфы с протеинами гемолимфы пчелы (Tewarson, 1981), а также включение белков пищи самки в яйца клеща без предварительного расщепления (Tewarson, Engels, 1982; Bruce et al., 1988).

Материалы и методы. Материалом служили развивающиеся особи клеща *Varroa*, извлеченные из зараженного трутневого расплода, а также образцы гемолимфы трутневой личинки пятого возраста и куколки с белыми и розовыми глазами. Отбор клещей по возрасту и полу проводили методом, описанным ранее (Барабанова, Пилецкая, 1989). Гомогенаты из яиц и целых нимф клеща готовили на десятикратно разведенном электродном буфере на холоде. Для более полной экстракции белков гомогенаты оставляли на некоторое время в холодильнике, а затем центрифугировали 15 мин при 15 000 об/мин. Фракционный состав белков определяли с помощью вертикального электрофореза в полиакриламидном геле по методу Орнштейна (Ornstein, 1964) и Девиса (Davis, 1964) в модификации для насекомых (Филиппович, Щеголева, 1967). Для электрофореза использовали пластинки с 7 %-м акриламидом для разделяющего и 2,5 %-м для концентрирующего геля. Электрофорез проводили в 0,05 М трисглициновом буфере pH 8,3 при 4 °C в течение 2—3 ч. В первые 20 мин подавалась сила тока 2 миллиампера на лунку, затем она удваивалась и оставалась постоянной до окончания фореза, который контролировался маркером (бромфеноловым синим). Гели окрашивали ... масси R-250. Фореграммы сканировали на микрофотометре ИФО-451. О тождественности белковых фракций судили по сопоставлению величин относительной электрофоретической подвижности (ОЭП). Относительное процентное содержание фракций определяли по соотношению площади каждого пика к общей площади фореграммы (Филиппович и др., 1975). Степень тождества белковых спектров различных стадий клеща и их пищи определяли на основании коэффициента идентичности $K_и$ (Коничева, 1975).

Результаты и обсуждение. Исследование белкового состава преимагинальных стадий клеща *Varroa* показало, что экстракты, полученные из гомогенатов яиц и нимф разного возраста и пола, содержат 10—16 белковых фракций (рисунок, *а—л*). Наиболее интенсивными на большей части фореграмм являются вторая и третья фракции, имеющие низкую ОЭП. Многие фракции на фореграммах представлены нечеткими размытыми полосами различной интенсивности. Согласно Ли Шао-вену с сотрудниками (Li Shao-wen et al., 1982) эти фракции могут быть частично гидролизованными белками.

Экстракты, полученные из гомогенатов отложенных яиц, содержат максимальное (16) количество белковых фракций. Наибольшей интенсивностью в их спектре обладает вторая фракция, которая по своему положению и интенсивности окраски обнаруживает большое сходство с соответствующей фракцией из гемолимфы трутневой запечатанной личинки, на которой накануне откладки яиц питалась самка клеща. Второй по интенсивности является высокоподвижная тринадцатая фракция,

по ОЭП сходная с альбуминами. Остальные фракции содержат небольшие или следовые количества белка, многие из них размыты (рисунок, *а*).

Сравнение белкового состава яйца с белковым спектром гемолимфы трутневой личинки пятого возраста показывает, что практически все фракции гемолимфы личинки присутствуют в белковом спектре яйца (рисунок, *а, м*). Тем не менее коэффициент идентичности у них не очень высокий ($К_и$=0,66).

Экстракты, полученные из гомогенатов мужских протонимф, по количеству белковых фракций почти не отличаются от яйца. Однако в их белковом спектре наблюдаются некоторые качественные и особенно количественные изменения. В частности, у них исчезают 3 фракции (6, 8, 12), характерные для гомогенатов яйца, и появляются две новые фракции (12 и 15), а в фракции, по ОЭП соответствующей второй фракции яйца, относительная концентрация белка снижается почти в два раза, увеличиваясь в рядом расположенных фракциях (3, 4, 5, 6, 7) (рисунок, *б*).

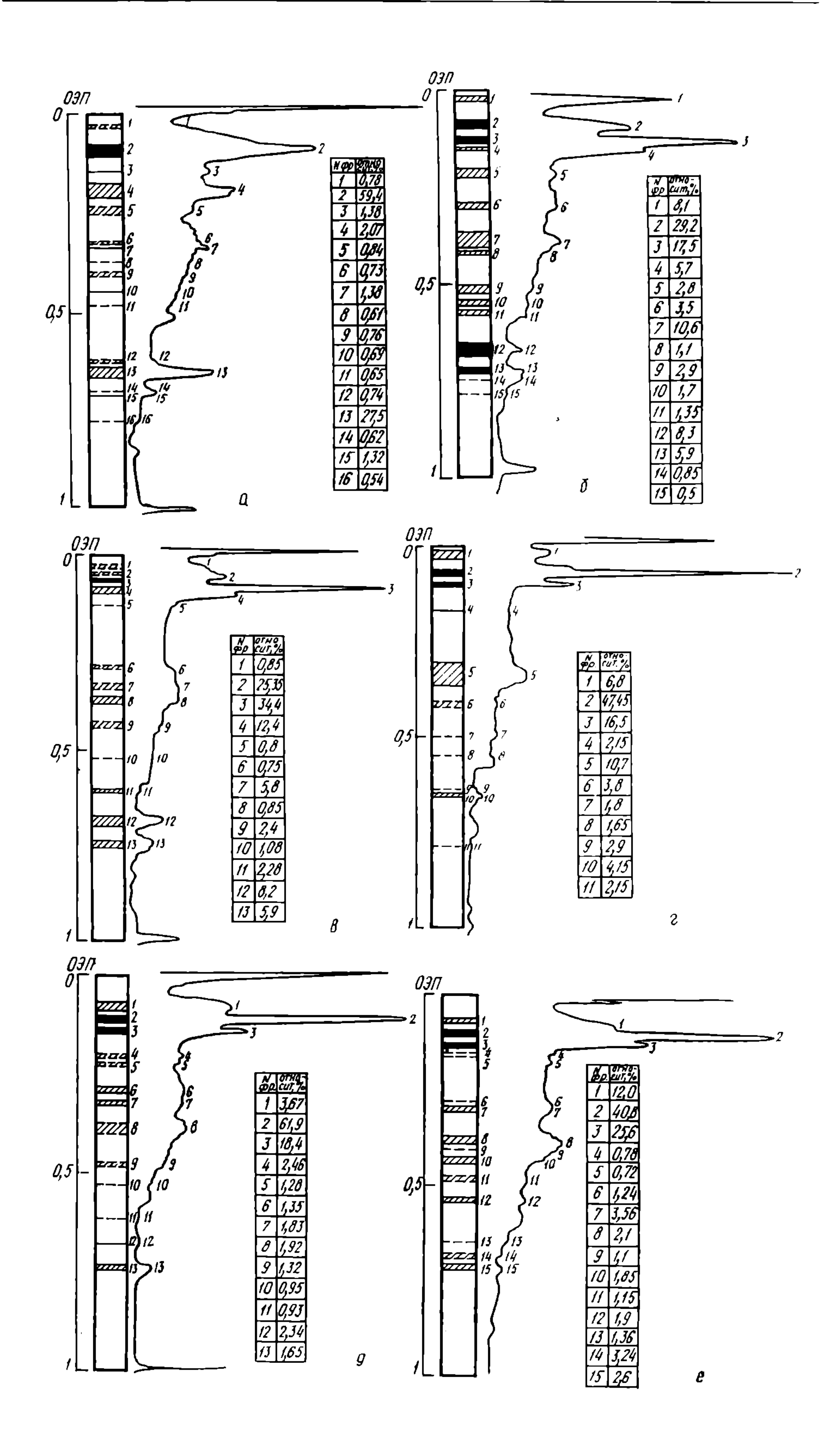
В гомогенатах активных женских протонимф белковый набор сокращается на 3 фракции (рисунок, *б*). У них не выявляется 6 фракций, присутствовавших в белковом спектре яйца (4, 6, 9, 14, 15, 16), но появляются 2 фракции (1, 2) с низкой ОЭП и 1(11) — с высокой (рисунок, *в*), а в четвертой фракции, соответствующей второй фракции яйца, относительная концентрация белка также снижается, повышаясь во второй и третьей.

В гомогенатах протонимфы, находящейся в состоянии предлиночного покоя (хризалис), белковый набор сокращается еще на две фракции (рисунок, *г, д*). При этом у женских особей исчезают две фракции (2, 5) с низкой ОЭП, а у мужских две фракции (11, 14) — с высокой. Кроме того, в некоторых фракциях с высокой ОЭП почти в 2 раза снижается относительное содержание белка. Несмотря на отмеченные изменения в белковом спектре протонимф обоего пола, коэффициент идентичности их белкового состава с белковым составом яйца достаточно высокий ($К_и$=0,7). Одной из причин этого тождества может быть то, что кишечник протонимфы заполнен еще достаточно большим количеством желтка, и преимущественным типом ее питания является лецитрофия.

Дейтонимфы клеща *Varroa* начинают активно питаться гемолимфой белой куколки, в связи с чем белковый набор их гомогенатов обогащается четырьмя фракциями (4, 5, 6, 9 — у женских особей и 4, 8, 12, 15 — у мужских) и в нескольких фракциях, преимущественно с низкой ОЭП, повышается относительная концентрация белка (рисунок, *е, ж*). Фракции, появившиеся в белковом спектре дейтонимф, по своему положению напоминают соответствующие белки гемолимфы куколки, несколько изменившие электрофоретическую подвижность (рисунок, *н*). Коэффициент идентичности белкового состава дейтонимф и их пищи неодинаковый у особей разного пола: у женских особей он существенно выше ($К_и$=0,78), чем у мужских ($К_и$=0,66). Эти различия могут служить еще одним подтверждением более высокой интенсивности питания женских дейтонимф.

У дейтохризалид разного пола белковый спектр гомогенатов изменяется по-разному. У женских особей белковый набор гомогената обедняется (исчезают фракции 1, 6, 9, 10), а у мужских — вместо 1 фракции появляется две новые с высокой подвижностью (рисунок, *з, и*) у дейтохризалиды так же, как у протохризалиды снижается относительное содержание белка в некоторых фракциях. Следовательно, в этот период происходит более интенсивный гидролиз белка, что согласуется с повышением протеолитической активности у хризалид (Барабанова, 1984).

Белковый набор гомогенатов молодых еще не питавшихся самок увеличивается на 4 фракции за счет того, что появляются две (4, 5) фракции с низкой ОЭП и две (13, 14) — с высокой (рисунок, *к*). В бел-



ОЭП
0
0,5
1
а

N фр	отно-сит. %
1	0,78
2	59,4
3	1,38
4	2,07
5	0,84
6	0,73
7	1,38
8	0,61
9	0,76
10	0,69
11	0,65
12	0,74
13	27,5
14	0,62
15	1,32
16	0,54

б

N фр	отно-сит. %
1	8,1
2	29,2
3	17,5
4	5,7
5	2,8
6	3,5
7	10,6
8	1,1
9	2,9
10	1,7
11	1,35
12	8,3
13	5,9
14	0,85
15	0,5

в

N фр	отно-сит. %
1	0,85
2	25,35
3	34,4
4	12,4
5	0,8
6	0,75
7	5,8
8	0,85
9	2,4
10	1,08
11	2,28
12	8,2
13	5,9

г

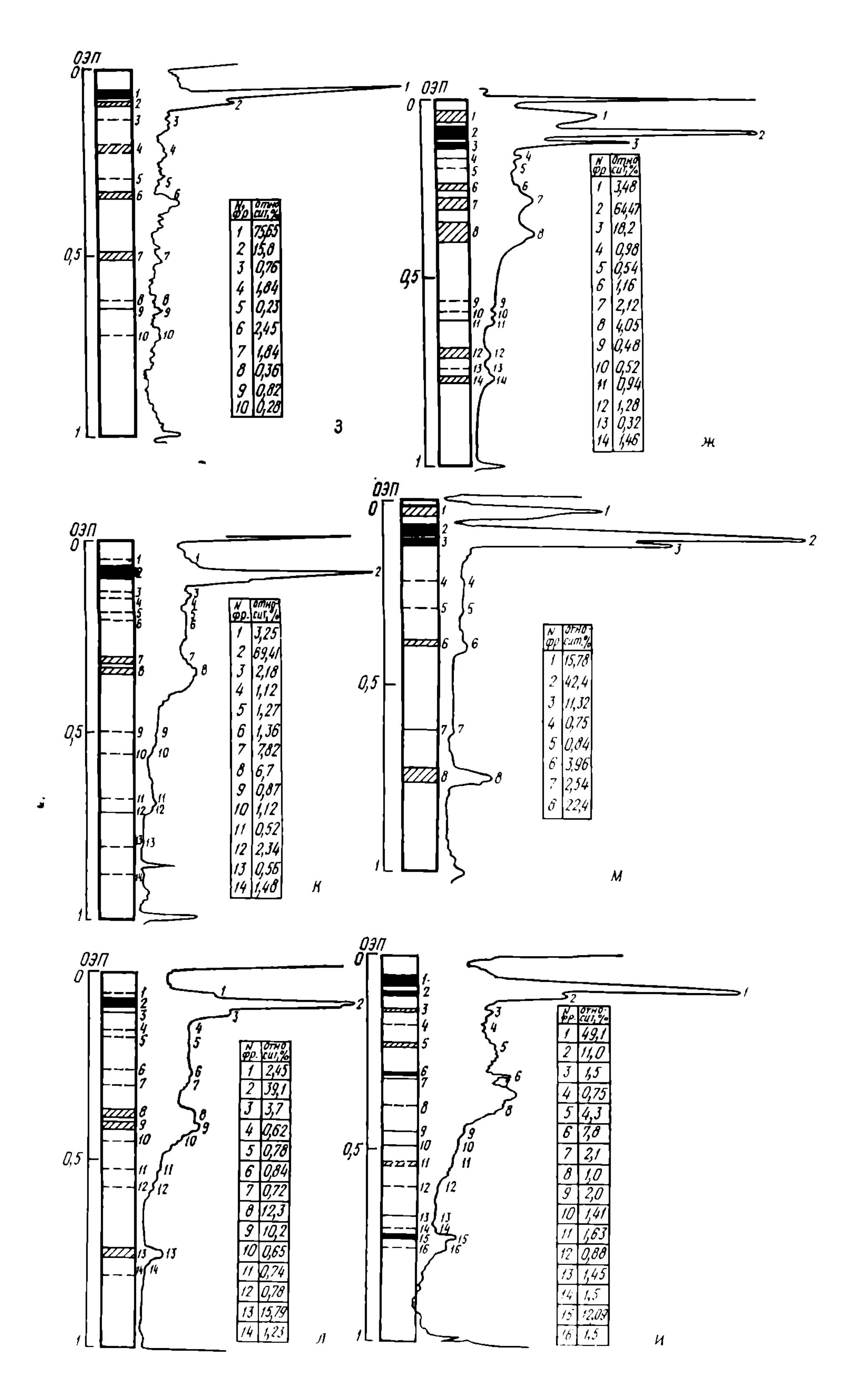
N фр	отно-сит. %
1	6,8
2	47,45
3	16,5
4	2,15
5	10,7
6	3,8
7	1,8
8	1,65
9	2,9
10	4,15
11	2,15

д

N фр	отно-сит. %
1	3,67
2	61,9
3	18,4
4	2,46
5	1,28
6	1,35
7	1,83
8	1,92
9	1,32
10	0,95
11	0,93
12	2,34
13	1,65

е

N фр	отно-сит. %
1	12,0
2	40,8
3	25,6
4	0,78
5	0,72
6	1,24
7	3,56
8	2,1
9	1,1
10	1,85
11	1,15
12	1,9
13	1,36
14	3,24
15	2,6



з

N фр	относит. %
1	75,65
2	15,8
3	0,76
4	1,84
5	0,23
6	2,45
7	1,84
8	0,36
9	0,82
10	0,28

ж

N фр	относит. %
1	3,48
2	64,47
3	18,2
4	0,98
5	0,54
6	1,16
7	2,12
8	4,05
9	0,48
10	0,52
11	0,94
12	1,28
13	0,32
14	1,46

к

N фр.	относит. %
1	3,25
2	69,41
3	2,18
4	1,12
5	1,27
6	1,36
7	7,82
8	6,7
9	0,87
10	1,12
11	0,52
12	2,34
13	0,56
14	1,48

м

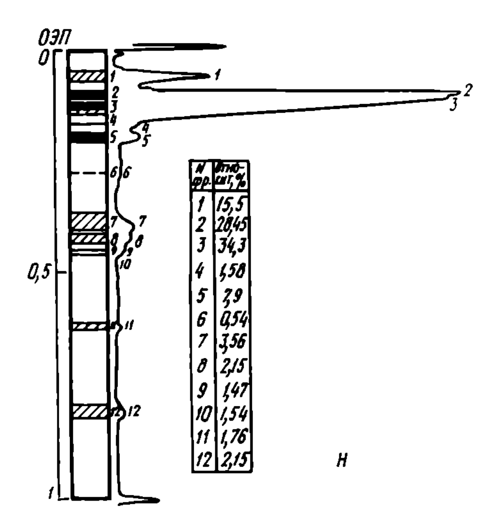
N фр	относит. %
1	15,78
2	42,4
3	11,32
4	0,75
5	0,84
6	3,96
7	2,54
8	22,4

л

N фр.	относит. %
1	2,45
2	39,1
3	3,7
4	0,62
5	0,78
6	0,84
7	0,72
8	12,3
9	10,2
10	0,65
11	0,74
12	0,78
13	15,79
14	1,23

и

N фр.	относит. %
1	49,1
2	11,0
3	1,5
4	0,75
5	4,3
6	7,8
7	2,1
8	1,0
9	2,0
10	1,41
11	1,63
12	0,88
13	1,45
14	1,5
15	12,09
16	1,5



Белковый состав гомогенатов из преимагинальных стадий клеща *V. jacobsoni* и их пищи — гемолимфы трутневой личинки пятого возраста и 14—16-дневной куколки:

а — эмбрионизированная личинка (яйцо); *б* — протонимфа мужская; *в* — протонимфа женская; *г* — протохризалида женская; *д* — протохризалида мужская; *е* — дейтонимфа мужская; *ж* — дейтонимфа женская; *з* — дейтохризалида женская; *и* — дейтохризалида мужская; *к* — самка молодая; *л* — самец; *м* — гемолимфа трутневой личинки; *н* — гемолимфа трутневой куколки.

ковом спектре гомогенатов молодых самцов исчезают 4 фракции с высокой ОЭП и появляются две фракции с низкой (1, 6) (рисунок, *л*).

Выявленные половые различия белкового состава нимф клеща свидетельствуют о неодинаковой скорости развития самца и самки и соответственно о разной интенсивности их белкового метаболизма. Более интенсивный метаболизм самки приводит к более существенным изменениям в белковом составе самок.

Несмотря на выявленные различия белкового состава гомогенатов развивающихся особей клеща, их белковые спектры существенно не различаются, о чем свидетельствует достаточно высокий коэффициент их идентичности ($K_и$=0,7—086). На фореграммах гомогенатов различных стадий развития клеща постоянно присутствуют 8 фракций, которые можно рассматривать как собственные белки клеща. Остальные фракции могут быть как функциональными белками, так и белками пищи. К числу фракций, постоянно присутствующих в белковом составе гомогенатов развивающихся особей клеща, относятся и две наиболее интенсивные фракции яйца, которые состоят, видимо, из комплекса белков с близко расположенными ОЭП. Не исключено, что это резервные белки, так как концентрация их на протяжении развития все время меняется, оставаясь достаточно высокой.

Выявлена достоверная степень тождества белкового состава гомогенатов нимф клеща с белками гемолимфы личинок и куколок расплода. Это согласуется с полученными ранее Теварсоном (Tewarson, 1981) данными об иммунологической идентичности белков гемолимфы клеща и пчелы.

Как уже упоминалось, белковый спектр яиц клеща *Varroa*, в отличие от лучше изученных в этом отношении иксодовых клещей (Краснобаева и др., 1971; Степенченок-Рудник и др., 1975; Белозеров, Лузев, 1977; Cons, Rosell-Davis, 1988; Rosell-Davis, Cons, 1988), практически полностью включает белки пищи самки, которая перед откладкой яиц питается на личинке расплода. Не исключено поэтому, что предположение Теварсона (1981) об использовании самками клеща белков гемолимфы в качестве вителлогенина не лишено оснований. Однако для подтверждения этого требуются дополнительные исследования.

Барабанова В. В. Изменчивость активности пищеварительных ферментов клещей Varroa jacobsoni в онтогенезе // Вестн. зоологии.— 1984.— № 5.— С. 76—79.

Барабанова В. В., Пилецкая И. В. Некоторые физиологические особенности онтогенеза клеща Varroa jacobsoni // Там же.— 1989.— № 6.— С. 51—54.

Белозеров В. Н., Лузев В. В. Электрофоретическое исследование белков гемолимфы, кишечника, экскрементов и яиц активных и диапаузирующих самок Dermacentor marginatus Sulz (Ixodidae) // Паразитология.— 1977.— **11**, № 1.— С. 35—42.

Коничева А. П. Сравнительное изучение белкового полиморфизма различных по происхождению и продуктивности пород тутового шелкопряда : Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1975.— 21 с.

Краснобаева З. Н., Степанченок-Рудник Г. И., Гроховская И. М. Исследование гомогенатов органов и гемолимфы кровососущих клещей методом электрофореза // Мед. паразитол.— 1971.— **40**, № 6.— С. 704—708.
Степанченок-Рудник Г. И., Гаржаев А. П., Гроховская И. М. Изучение белкового спектра органов напитавшихся и голодных клещей Hyalomma dromedarii методом электрофореза в полиакриламидном геле // Там же.— 1975.— **44**, № 4.— С. 443—437.
Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей биохимии.— М. : Просвещение, 1975.— 318 с.
Филиппович Ю. Б., Щеголева Л. И. Исследование растворимых белков тканей тутового шелкопряда Bombyx mori L. методом электрофореза в полиакриламиднсм геле // Докл. АН СССР.— 1967.— **174**, № 1.— С. 240—242.
Bruce W. A., Chiesa F., Marcheffi A., Griffiths D. A. Laboratory feeding of Varroa jacobsoni Oudemans on natural and artifical diets (Acari : Varroidae) // Apidologie.— 1988.— **19**, N 2.— P. 209—217.
Cons L. B., Rosell-Davis R. The relationship between feeding vitellogenin production and vitellogenesis in the tick Dermacentor variabilis // Proc. 18th Intern. Congr. Entomol., Vancouver, July 3—9, 1988.— P. 263.
Davis B. J. Disk electrophoresis I. Method and application to human serum proteins // Ann: N. Y. Acad. Sci.— 1964.— **121**.— P. 404—428.
Li Shao-wen, Yang Qien-mai, Meng Yu-pin, Chang J. T. at al. Studies on the haemolimph protein of two species of honeybees, Apis mellifera and A. cerana // Acta entomol. Sinica.— 1982.— **25**, N 2.— P. 321—330.
Ornstain Z. Disk electrophoresis. I. Background and theory // Ann. N. Y. Acad. Sci.— 1964.— **121**.— P. 185—190.
Rosell-Davis R., Cons L. B. Purification and characterization of vitellin from the eggs of Dermacentor variabilis // Proc. 18th Intern. Congr. Entomol., Vancouver 3—9 July, 1988.— P. 143.
Tewarson N. C. Immunologische Untersuchungen fur Eruahrung und Fortpflanzung von Varroa jacobsoni // Diagnose und Terapie der Varroatose.— Intern. Sympos. uber Bienenbiologie, Oberrusel 19.9—1.10 1980.— Apimondia.— Verlag : Bukarest.— 1981.— S. 39—47.
Tewarson N. C., Engels W. Undigestiol of nonhost proteins by Varroa jacobsoni // Apimologie.— 1982.— **21**. N 4.— P. 222—225.

Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена АН УССР (Киев)

Получено 17.03.89

УДК 595.422:591.5

И. В. Пилецкая, С. Г. Погребняк

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕЩЕЙ VARROA JACOBSONI В ТРУТНЕВОМ РАСПЛОДЕ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ

В настоящее время широко распространен один из способов борьбы с варроатозом — удаление трутневого расплода, более предпочитаемого паразитом, чем пчелиный расплод. В связи с этим представляют практический интерес вопросы пространственного и количественного распределения клещей в расплоде, возможная зависимость их распределения от микроклиматических условий гнезда.

На характер распределения клещей в расплоде существуют самые противоречивые точки зрения. Так, Фремут (Fremuth, 1984) связывает распределение клещей в расплоде с наружной температурой и утверждает, например, что в разгар лета *Varroa* предпочитает самые кромочные участки, а в более холодное время — центр гнезда. Сальченко (1972), Полтев (1973), Докторов и др. (1980) полагают, что самки *Varroa* чаще откладывают яйца в ячейки с расплодом, расположенные по краям и в нижней части сотов (в сильно зараженных семьях), где по сравнению с центром гнезда температура более благоприятна для их развития. По подсчетам этих авторов 48—80 % всех клещей, находящихся в трутневом расплоде, собираются на крайних сотах. По наблюдениям Артеменко и Сабадина (1983), Ветловой и Гапоновой (1984), на трутневых сотах наибольшее число клещей скапливается в зонах с самой стабиль-